

(12) Übersetzung der europäischen  
**PATENTCHRIFT**  
Veröffentlichungsnummer: 0 258 068 B1

(21) Anmeldenummer: 87307684

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>: C11D 3/386

(22) Anmeldetag: 28. 8.1987

(45) Ausgabetag: 10. 4.1995

(54) ENZYMHALTIGER REINIGUNGSMITTELZUSATZ.

(30) Priorität:

29. 8.1986 DK 4117/86  
9.10.1986 DK 4816/86

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

2. 3.1988, Patentblatt 88/09

(45) Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:

31. 8.1994, Patentblatt 94/35

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A -0206390 US-A -4421664  
COONEY AND EMMERSON, "THERMOPHILIC FUNGI",  
(W.H. FREEMAN AND CO.), 1964

(73) Patentinhaber:

NOVO NORDISK A/S  
NOVO ALLE  
DK-2880 BAGSVAERD (DK).

(72) Erfinder:

HUGE-JENSEN, IDA BIRGITTE  
VED KIGNAES 11  
DK-3630 JAEGERSPRIS (DK).

GORMSEN, ERIK  
VERMUNDSGADE 12, 1.TH  
DK-2100 KÖBENHAVN Ø (DK).

Anmerkung:

Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jeder beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß § 5 PatVEG vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Österreichischen Patentamt nicht geprüft!

sind zu finden in US 4,011,169 (Spalte 4, Zeile 65 bis Spalte 5, Zeile 68), in GB 1,293,613 (Seite 2, Zeilen 6-29) und in dem von T. Fujii mit dem Titel "Washing of Oil Stains with Lipase" (in japanisch) beim 16. Symposium on Washing, abgehalten in Tokyo am 17.-18. September 1984, ausgegebenen Papier.

Unter den bekannten Lipasen, die als Reinigungsmittelzusätze verwendet werden, besitzt nach unserem besten Wissen die Fusarium oxysporum-Lipase die besten lipolytischen Eigenschaften, gesehen vom Standpunkt der Reinigungsmittelanwendung, siehe unsere Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 0 130 064, insbesondere die Vergleichstabelle auf Seite 27.

Wenn das Waschverfahren bei hoher Temperatur und hoher Alkalität durchgeführt wird, wird der Großteil des fetthaltigen Schmutzes ohnehin entfernt werden. Es werden jedoch heutzutage allgemein Nieder- oder Mitteltemperatur-Waschverfahren (um 60°C und darunter) verwendet, und bei diesen niedrigen Temperaturen können die bekannten Lipasen nur einen kleinen Teil des fetthaltigen Schmutzes auflösen.

Bisher ist die Wirksamkeit lipolytischer Reinigungsmittelzusätze üblicherweise durch Waschen von EMPA (Eidgenössische Materialprüfungs- und Versuchsanstalt, St. Gallen, Schweiz)-Stoffproben Nr. 101 (Olivenöl/Baumwolle) und 102 (Olivenöl/Wolle) durch Adaptation des Verfahrens, das im Britischen Patent Nr. 1,361,386 (insbesondere Seiten 4 und 7) und US-Patent Nr. 3,723,250 (insbesondere Spalten 15-19) beschrieben ist, gemessen worden. Auf diese Weise kann lipolytische Reinigungswirksamkeit ausgedrückt werden als der Differenzreflexionswert AR. Hier wurden jedoch zwei direktere Maße für lipolytische Wirkung verwendet. Erstens wurde das Gewicht des auf dem Textil zurückbleibenden Öls bestimmt; dies zeigt

ANSON-Einheiten/g Zusatz liegt.

In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung einen enzymhaltigen Reinigungsmittelzusatz bereit, der als wirksame Bestandteile eine mikrobiell produzierte Lipase und ein proteolytisches Enzym enthält, wobei die Lipase immunologisch mit einer von einem Humicola sp. produzierten Lipase kreuzreagiert und wobei die proteolytische Aktivität eine alkalische Bacillus-Protease ist. Vorzugsweise ist das proteolytische Enzym mikrobiell aus Bacillus licheniformis hergestellt oder ist gemäß US-Patent Nr. 3,723,250 hergestellt.

Die gut bekannte Anson-Hämoglobin-Methode für proteolytische Aktivität ist beschrieben im Journal of General Physiology, 22, 79-89 (1959).

Weitere Aspekte der Erfindung stellen eine Reinigungsmittelzusammensetzung, die eine mikrobiell produzierte Lipase und ein proteolytisches Enzym umfaßt, wobei die Lipase immunologisch mit einer von einem Humicola sp. produzierten Lipase kreuzreagiert und wobei die proteolytische Aktivität zwischen etwa 0,0005 und 0,15 ANSON Einheiten/g Reinigungsmittel liegt, und eine Reinigungsmittelzusammensetzung, die eine mikrobiell produzierte Lipase und ein proteolytisches Enzym umfaßt, wobei die Lipase immunologisch mit einer von einem Humicola sp. produzierten Lipase kreuzreagiert und wobei das proteolytische Enzym eine alkalische Bacillus-Protease ist, bereit. Vorzugsweise ist das proteolytische Enzym mikrobiell aus Bacillus licheniformis hergestellt oder ist gemäß US-Patent Nr. 3,723,250 hergestellt.

Schließlich stellt die Erfindung ein Waschverfahren unter Verwendung der obigen Reinigungsmittelzusammensetzung bei einem pH zwischen 7 und 12 bereit.

daß H. lanuginosa-Lipase überraschenderweise hervorragend kompatibel ist mit LAS, einem üblicherweise verwendeten anionischen Tensid.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

##### Lipase-produzierende Mikroorganismen.

Lipasen der Erfindung können aus Stämmen von thermophilem Humicola sp., auch klassifiziert als thermophiler Thermomyces sp., gewonnen werden. Beispiele für geeignete Stämme sind H. lanuginosa (Griffon und Maublanc) Bunce, H. stellata Bunce, H. grisea var. thermoidea, Cooney & Emerson, H. insolens, Cooney & Emerson, Thermomyces ibadanensis, Apinis & Eggins, H. hvalothermophila Moubasher, Mazen und Abdel-Hafez, H. grisea var. indica Subrahmanyam, H. brevis var. thermoidea Subrahmanyam und Thirumalachar und H. brevispora Subrahmanyam und Thirumalachar.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des enzymhaltigen Reinigungsmittelzusatzes gemäß der Erfindung ist die Lipase von H. lanuginosa (Griffon und Maublanc) Bunce, H. brevispora Subrahmanyam und Thirumalachar, H. brevis var. thermoidea Subrahmanyam und Thirumalachar oder H. insolens Cooney & Emerson produzierbar.

H. lanuginosa ist auch unter den Synonymen Thermomyces lanuginosus Tsiklinsky, Sepedonium lanuginosum Griffon und Maublanc, Sepedonium thermophilum cyclosporum und S. thermophilum ovosporum Velich, Acremoniella sp. Rege, Acremoniella thermophila Curzi und Monotospora lanuginosa (Griffon und Maublanc) Mason beschrieben worden.

Überdies wurde die Spezies Scytalidium thermophilum (Cooney & Emerson) Austwick von Hedger (1975, The ecology of thermophi-

einer der oben genannten Spezies<sup>n</sup>, insbesondere H. lanuginosa, und insbesondere aus einem der obengenannten Stämme, besonders DSM 3819 und DSM 4109.

Die Identitäts(Kreuzreaktions)-Tests können mit dem gut bekannten Ouchterlony-Doppelimmundiffusionsverfahren oder mit der Tandem-gekreuzten Immunelektrophorese gemäß N.H. Axelsen: Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques (Blackwell Scientific Publication, 1983), Kapitel 5 und 14, durchgeführt werden. Die Ausdrücke "antigenische Identität" und "teilweise antigenische Identität" sind in demselben Buch beschrieben, Kapitel 5, 19 und 20.

Unter Verwendung monospezifischen Kaninchen-Antiserums, gezüchtet gegen gereinigte Lipasen aus DSM 4109, stellten wir fest, daß die Lipasen aus den Stämmen DSM 3819, DSM 4109, DSM 4110 und DSM 4111 nach beiden der obengenannten Methoden alle antigenisch identisch sind. Produktion von Antiserum ist beschrieben in N.H. Axelsens Buch, Kapitel 41. Reinigung von Lipase ist beschrieben in W-H Liu, Agr.Biol.Chem., 37(1), 157-163 (1973); wir stellten jedoch fest, daß die Säulenchromatographie geeigneter durchgeführt werden kann durch die Verwendung von : DEAE-Sepharose (Anionenaustauschchromatographie), Phenyl-Sepharose (Chromatographie der hydrophoben Wechselwirkung), gefolgt von Gelfiltration auf TSK G3000SW.

#### Enzymchemische Charakterisierung der Lipasen

Die pH-Abhängigkeit der Aktivität wurde mit einem traditionellen Verfahren bestimmt, unter Verwendung von Tributyrin als Substrat bei 30°C in einem pH-staten und mit Gummi arabicum als Emulgator. Die Aktivität bei verschiedenen pHs wurde aus dem Alkaliverbrauch gegen die Zeit bestimmt.

pH-Abhängigkeit wurde auch mit einem realistischeren Substrat,

Im Falle einer flüssigen Formulierung neigt die Lagerstabilität dazu, unbefriedigend zu sein, und eine Flüssigkeit mit einem Enzymstabilisator ist daher bevorzugt. Der Stabilisator kann Propylenglykol oder andere Substanzen sein, die als Stabilisatoren für Enzymlösungen bekannt sind. Wie später in dieser Beschreibung gezeigt werden wird, besitzt eine reine wäßrige Lösung der Lipase der Erfindung schlechte Lagerstabilität, diese kann aber durch die Einbeziehung von Stabilisatoren, z.B. Propylenglykol, merkbar verbessert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des enzymhaltigen Reinigungsmittelzusatzes gemäß der Erfindung beträgt die Lipaseaktivität über etwa 10.000 LU/g Zusatz. Lipase Unit (LU) wird später in dieser Beschreibung definiert werden. In diesem Fall wird eine geeignete Lipaseaktivität in der Waschlösung erzeugt, wenn der Reinigungsmittelzusatz zum Reinigungsmittel in einer Menge von 0,1 bis 5,0 g/100 g Reinigungsmittel zugegeben wird und wenn das Reinigungsmittel zur Waschlösung in einer Menge von 0,5-20 g Reinigungsmittel/l Waschlösung zugegeben wird.

#### Proteolytisches Enzym

Im Reinigungsmittelzusatz der Erfindung sind alkalische Bacillus-Proteasen wegen ihrer gutbekannten Wirksamkeit als Reinigungsmittelproteasen bevorzugt. Als solche Enzyme können das mikrobiell durch Kultivierung von Bacillus licheniformis hergestellte proteolytische Enzym oder die gemäß US-Patent Nr. 3,723,250 hergestellten proteolytischen Enzyme verwendet werden. Solche proteolytischen Enzyme sind erhältlich von Novo Nordisk A/S, unter den Warenzeichen Alcalase®, Savinase® und Esperase®. Der enzymhaltige Reinigungsmittelzusatz der Erfindung kann entweder durch Mischen eines vorher hergestellten Proteinase-Granulats mit einem vorher hergestellten Lipase-Granulat oder durch Mischen eines Proteinase-Konzentrats mit

ter 1.000-5.000 LU/l. Demgemäß beträgt in einer bevorzugten Ausführungsform die Lipaseaktivität im Reinigungsmittel 50-20.000 LU/g, bevorzugter 50-10.000 LU/g, noch bevorzugter 250-2.000 LU/g und am bevorzugtesten 500-2.000 LU/g Reinigungsmittel.

Wie oben erwähnt, ist die bevorzugte Lipase im Zusatz über 10.000 LU/g und diese wird zu den Reinigungsmitteln in Mengen von 0,1-5 Gew.-% und bevorzugter 0,2-2 Gew.-% zugegeben. Demgemäß beträgt in einer anderen bevorzugten Ausführungsform die Lipaseaktivität im Reinigungsmittel 10-500 LU/g, bevorzugter 20-200 LU/g Reinigungsmittel.

Gemäß der obengenannten bevorzugten Bereiche für Proteaseaktivität im Zusatz und für die Menge an Zusatz im Reinigungsmittel bevorzugen wir eine Proteaseaktivität im Reinigungsmittel von 0,0005-0,15 AU/g, bevorzugter 0,001-0,060 AU/g, noch bevorzugter 0,003-0,025 AU/g und am bevorzugtesten 0,006-0,010 AU/g Reinigungsmittel.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Reinigungsmittels gemäß der Erfindung umfaßt das oberflächenaktive Material 30-100% anionisches und 0-70% nicht-ionisches Tensid, am bevorzugtesten 50-100% anionisches und 0-50% nicht-ionisches Tensid. Das Reinigungsvermögen von Lipase dieser Erfindung ist besonders ausgeprägt in Reinigungsmitteln mit einem hohen Gehalt an anionischen Tensiden, wie etwa LAS (lineares Alkylbenzolsulfonat).

#### Waschverfahren

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Waschverfahrens gemäß der Erfindung enthält die Waschlösung das Reinigungsmittel gemäß der Erfindung in einer Menge von 0,5 und 20 g/l Waschlösung. Auf diese Weise wird eine geeignete Lipaseak-

Minuten entfernt. 5,9 Liter Überstand wurden erhalten. Der Überstand wurde durch ein 10 µ-Nylon-Filtertuch vor einer 8 x Konzentration durch Ultrafiltration auf dem Pellicon-UF-Cassette-System (Membranen mit NMWL von 10.000, wobei NMWL eine Abkürzung für nominale Grenze der relativen Molekülmasse ist) filtriert.

Das UF-Konzentrat (Endvolumen 740 ml) wurde durch Gefrier-trocknung in ein Rohpulver überführt. Dieses Rohpulver zeigte eine Lipaseaktivität von 13.310 LU/g.

Zusammensetzung von YPG-Agar war wie folgt:

Hefeextrakt, Difco	4	g/l
Glucose	15	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	g/l
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5	g/l
Agar	20	g/l

Autoklaviert bei 121°C für 40 Minuten.

Zusammensetzung von PL-1c-Medium war wie folgt:

Pepton	15	g/l
Tween-80	18	g/l
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2	g/l
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,1	g/l
Nalco-10	2	g/l
pH vor Auto- klavieren	6,0	

Autoklaviert bei 121°C für 40 Minuten.



sultierenden gefriergetrockneten Pulver zeigten die folgenden Lipaseaktivitäten:

Stamm	DSM 4111	DSM 4109	DSM 4110	DSM 1800
LU/g	32.000	211.000	6.600	1.800

#### Waschverfahren

Das für Waschversuche eingesetzte Testmaterial war Baumwollgewebe (mit einem Oberflächengewicht, das etwa  $1,2 \text{ g/50 cm}^2$  entsprach), imprägniert mit Olivenöl (Sigma 0-1500). Die Stoffproben wurden hergestellt, indem einfach 50 oder 85  $\mu\text{l}$  (wie angegeben) Olivenöl, das auf  $50-60^\circ\text{C}$  erhitzt worden war, auf die Mitte jeder Teststoffprobe ( $7 \times 7 \text{ cm}$ ) mittels einer Mikropipette getropft wurden. Nach dem Aufbringen des Öls wurden die Stoffproben bei Raumtemperatur für etwa 2 Tage gealtert.

Die Lipasezubereitungen aus den Beispielen 1 und 2 wurden verwendet, jede identifiziert durch die Stamm-Nummer.

Auch wurde als ein Vergleich ein lipolytisches Pulver auf der Basis von *Fusarium oxysporum*, erhalten wie in Beispiel 23 in der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 0 130 064 beschrieben und den wirksamsten bekannten lipolytischen Reinigungsmittelzusatz darstellend, verwendet. Die Aktivität der *Fusarium oxysporum*-Lipasezubereitung betrug 90.000 LU/g.

Die Lipasen wurden in Waschtests in einer Terg-O-Tometer-Testwaschmaschine bewertet. Der Terg-O-Tometer-Testwaschmaschine ist beschrieben in Jay C. Harris, Detergency evaluation und testing, Interscience Publishers Ltd., 1954, Seiten 60-61.

Nach gravimetrischer Bestimmung von Restsubstanz wurde der getrocknete Extrakt erneut in 20 ml Hexan gelöst und 5 ml eines internen Standards (Lithocholsäure, 12,5 mg/ml), gelöst in Ethanol, wurden zugegeben. 1 µl Probe wurde für jede Analyse verwendet.

Auf der Basis von Standardkurven für Triolein, Diolein, Monoolein und Ölsäure wurde die relative Zusammensetzung (Gew.-%) des Restöls berechnet.

Die Anzahl nicht-hydrolysierteter Glyceridbindungen im Restöl wurden unter Verwendung der folgenden Formel berechnet:

$$n = 10 \times M \left( \frac{3}{885} \times X_{TG} + \frac{2}{621} \times X_{DG} + \frac{1}{357} \times X_{MG} \right) \quad (\mu\text{mol})$$

in der  $X_{TG}$  der Prozentanteil Triglycerid ist (Gew.-%)

$X_{DG}$  der Prozentanteil Diglycerid ist (Gew.-%)

$X_{MG}$  der Prozentanteil Monoglycerid ist (Gew.-%)

M die Rest-Ölmenge ist (mg)

885, 621 und 357 die Molgewichte für Triolein, Diolein bzw. Monoolein sind.

### BEISPIEL 3

#### Effekt der Washtemperatur

Dieses Beispiel belegt die Wirkung der *Humicola lanuginosa*-Lipase (DSM 3819) in einem anionischen Reinigungsmittel bei verschiedenen Washtemperaturen.

Reinigungsmittelzusammensetzung: LAS (0,5 g/l),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1,0 g/l)

Waschzeit: 20 min

Lipasedosierung: 3000 LU/l

Waschzeit (min)		ohne Lipase	Fusarium oxysporum	Humicola lanuginosa
20	Restöl (mg)	185	187	165
	n (µmol)	590	571	360
40	Restöl (mg)	177	167	128
	n (µmol)	568	526	246
60	Restöl (mg)	141	147	93
	n (µmol)	465	454	153
90	Restöl (mg)	139	135	78
	n (µmol)	431	419	111

#### BEISPIEL 5

##### Effekt der Wasserhärte auf das Waschen

Dieses Beispiel zeigt den Einfluß der Wasserhärte auf das Reinigungsvermögen von Humicola lanuginosa-Lipase (DSM 3819). Die Härte (°dH = °deutsche Härte) wurde durch Mischen von Leitungswasser und destilliertem Wasser eingestellt.

Waschmittelzusammensetzung: LAS (0,5 g/l), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,0 g/l)  
Temperatur: 30°C  
Waschzeit: 20 min  
Lipasedosierung: 3000 LU/l  
pH (anfänglich): 9,5  
Verschmutzung: 85 µl Olivenöl

Die verwendeten verschmutzten Stoffproben waren eine von den Beispielen 2-5 verschiedene Charge, so daß die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind.

Lipasedosierung, LU/ml	0	500	1500	3000	6000	10.000
------------------------	---	-----	------	------	------	--------

Restöl (mg)	232	209	202	202	194	176
n (µmol)	761	558	521	471	437	363

#### BEISPIEL 7

#### Vergleich von Humicola-Lipasen beim Waschen

Dieses Beispiel vergleicht die Waschwirkung, die mit Lipase aus H. Lanuginosa (DSM 4109), H. brevis var. thermoidea (DSM 4111), H. brevispora (DSM 4110) und H. insolens (DSM 1800) erhalten wird.

Reinigungsmittelzusammensetzung:	LAS	0,50 g/l
	Talgseife	0,05 -
	Alkoholethoxylat	0,10 -
	(C <sub>12-14</sub> , 6EO)	
	Alkoholethoxylat	0,02 -
	(C <sub>16-18</sub> , 30EO)	
	Zeolith	1,20 -
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,50 -
	Natriummetasilicat	0,10 -
	EDTA	0,01 -
	(Titriplex III)	
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,00 -
Temperatur:	30°C	
Waschzeit:	20 min	
Lipasedosierung:	6000 LU/l	
pH:	9,5	
Verschmutzung:	50 µl Olivenöl	

stellt.

Reinigungsmittel: 1,3 g/l eines Nicht-Phosphatpulvers,  
das 25% Tensid (alpha-Olefinsulfonat  
(AOS) und lineares Alkylbenzolsulfonat  
(LAS)), Natriumsulfat, Zeolith, Natri-  
umsilicat und optischen Aufheller ent-  
hält.

Wasserhärte: 4,5° deutsche Härte

pH: 10,0 (eingestellt)

Temperatur: 25°C

Lipaseaktivität  
(anfänglich): 3000 LU/l

Proteaseaktivität: 0 oder 0,05 CPU/l

Restlipaseaktivität (%):

1) Protease: SAVINASE

Lipase	Inkubationszeit (min)				
	0	15	30	60	90
Humicola lanuginosa	100	99	94	91	89
Fusarium oxysporum	100	32	14	3	-
Pseudomonas fluorescens	100	1	0	-	-

1) Protease: SAVINASE

Lipase	Inkubationszeit (min)				
	0	15	30	60	90
Humicola lanuginosa	100	99	98	97	97
Fusarium oxysporum	100	5	0	-	-
Pseudomonas fluorescens 100	0	-	-	-	-

2) Protease: ALCALASE

Lipase	Inkubationszeit (min)				
	0	15	30	60	90
Humicola lanuginosa	100	98	97	95	95
Fusarium oxysporum	100	24	4	0	-
Pseudomonas fluorescens 100	18	0	-	-	-

3) Protease: ESPERASE

Lipase	Inkubationszeit (min)				
	0	15	30	60	90
Humicola lanuginosa	100	97	96	96	98
Fusarium oxysporum	100	20	0	-	-
Pseudomonas fluorescens 100	0	-	-	-	-

Ergebnisse:

	1,2-Propandiol (ml/ml)	Sorbit (g/ml)	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (mg/ml)	ANFANGS- AKTIVITÄT (LU/ml)	Restaktivität (%), Tage				
					0	2	13	29	49
1	0	0	0	4520	100	17	2	< 1	< 1
2	0,50	0	0	4520	100	93	63	35	34
3	0,50	0	3	4720	100	86	76	54	48
4	0	0,30	0	4880	100	57	10	< 1	< 1

Diese Ergebnisse belegen, daß 1,2-Propandiol (MPG = Monopropylenglykol) ein hervorragender Stabilisator für Humicola-Lipase ist. Die Lagerstabilität kann weiter durch Zugabe von Ca-Salz verbessert werden. Sorbit hat eine geringfügige stabilisierende Wirkung.

Ein Waschversuch wurde mit einer stabilisierten flüssigen Lipasezubereitung mit der folgenden Zusammensetzung durchgeführt:

Lipase aus <i>Humicola lanuginosa</i> DSM 4109	5000 LU/ml
1,2-Propandiol	50 Vol.-%
enthioniertes Wasser	50 Vol.-%
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3 mg/ml

Reinigungsmittelzusammensetzung: LAS (0,5 g/l), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,0 g/l)  
 Temperatur: 30°C  
 Waschzeit: 20 Minuten  
 pH: 9,5  
 Verschmutzung: 50 µl Olivenöl  
 Lipasedosierung: 1 ml stabilisierte flüssige Zubereitung pro Liter Waschlauge.

- 5% Polyethylenglykol (MW 600)
- 11,25%  $\text{TiO}_2$ /Mg-Silicat (4:1)
- 4% Polyethylenglykol (MW 600)

Das beschichtete Granulat wurde mit Luft bei 0,8 m/s für 10 Minuten angeblasen, um Feinteile des Beschichtungsmaterials zu entfernen. Schließlich wurde das Material wieder gesiebt und der 300-850  $\mu\text{m}$ -Bereich wurde gesammelt. Ein staubfreies, verfärbt weißes Granulat wurde erhalten.

Ausbeute und Aktivität waren wie folgt:

gefriergetrocknetes Pulver	92.700 LU/g	12,3 g
nicht-beschichtetes Granulat	21.100 -	45,0 -
beschichtetes Granulat	18.200 -	

Ein Waschversuch wurde mit dem gefriergetrockneten Pulver und dem Granulat durchgeführt, wie folgt:

Reinigungsmittelzusammensetzung:	LAS (0,5 g/l), $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1,0 g/l)
Temperatur:	30°C
Waschzeit:	20 Minuten
Lipasedosierung:	6000 LU/l
pH:	10,0
Verschmutzung:	50 $\mu\text{l}$ Olivenöl

Ergebnisse:

Lipasezubereitung	n ( $\mu\text{mol}$ )
keine	515
gefriergetrocknetes Pulver	386
Granulat	415



thermophila Curzi und Montospora lanuginosa (Griffon und Maublanc) Mason), H. brevispora Subrahmanyam und Thirumalachar, H. brevis var. thermoidea Subrahmanyam und Thirumalachar und H. insolens Cooney & Emerson.

6. Der enzymatische Reinigungsmittelzusatz nach Anspruch 5, wobei der Stamm H. lanuginosa DSM 3819 ist.
7. Der enzymatische Reinigungsmittelzusatz nach einem der Ansprüche 1-6, wobei das Additiv als ein nicht-staubendes Granulat oder eine Flüssigkeit bereitgestellt ist.
8. Der enzymatische Reinigungsmittelzusatz nach einem der Ansprüche 1-6, wobei der Zusatz als eine Flüssigkeit bereitgestellt ist, die einen Enzymstabilisator enthält.
9. Der enzymatische Reinigungsmittelzusatz nach Anspruch 8, wobei der Stabilisator Propylenglykol ist.
10. Der enzymatische Reinigungsmittelzusatz nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die Lipaseaktivität über etwa 10.000 LU/g Zusatz liegt (wobei 1 LU (Lipase Unit) die Enzymmenge ist, die 1 µmol titrierbare Buttersäure aus Tributyrin pro Minute bei 30°C, pH 7,0, mit Gummi arabicum als einem Emulgator freisetzt).
11. Der enzymhaltige Reinigungsmittelzusatz nach Anspruch 1, wobei das proteolytische Enzym eine alkalische Bacillus-Protease ist.
12. Der enzymhaltige Reinigungsmittelzusatz nach Anspruch 11, wobei das proteolytische Enzym mikrobiell mit Hilfe von Bacillus licheniformis hergestellt ist oder gemäß US-Patent Nr. 3,723,250 hergestellt ist.

20. Die Reinigungsmittelzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13-19, bereitgestellt als ein Pulver oder eine Flüssigkeit.
21. Die Reinigungsmittelzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13-20, wobei das oberflächenaktive Material von 30 bis 100 Gewichts-% anionisches Tensid und 0 bis 70 Gewicht-% nicht-ionisches Tensid umfaßt.
22. Die Reinigungsmittelzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13-21, wobei die Lipaseaktivität zwischen 50 und 20.000 LU/g Reinigungsmittel liegt (wobei 1 LU (Lipase Unit) die Enzymmenge ist, die 1  $\mu$ mol titrierbare Buttersäure aus Tributyrin pro Minute bei 30°C, pH 7,0, mit Gummi arabicum als einem Emulgator freisetzt).
23. Die Reinigungsmittelzusammensetzung nach einem der Ansprüche 15-22, wobei die Proteaseaktivität zwischen 0,0005 und 0,15 ANSON-Einheiten/g Reinigungsmittel liegt.
24. Ein Waschverfahren unter Verwendung der Reinigungsmittelzusammensetzung nach einem der Ansprüche 13-23 bei einem pH zwischen 7 und 12.
25. Das Waschverfahren nach Anspruch 24, wobei die Waschlösung das Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 13-23 in einer Menge von zwischen 0,5 und 20 g pro Liter Waschlösung enthält.

Fig.1

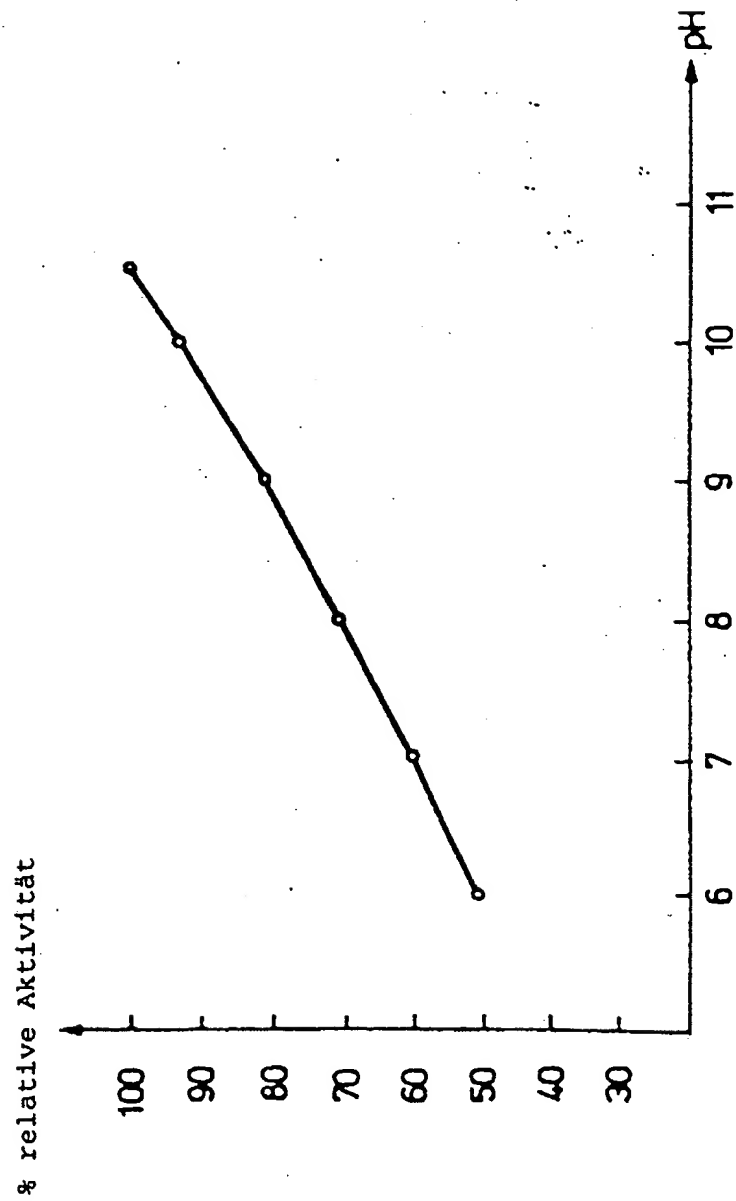


Fig. 2

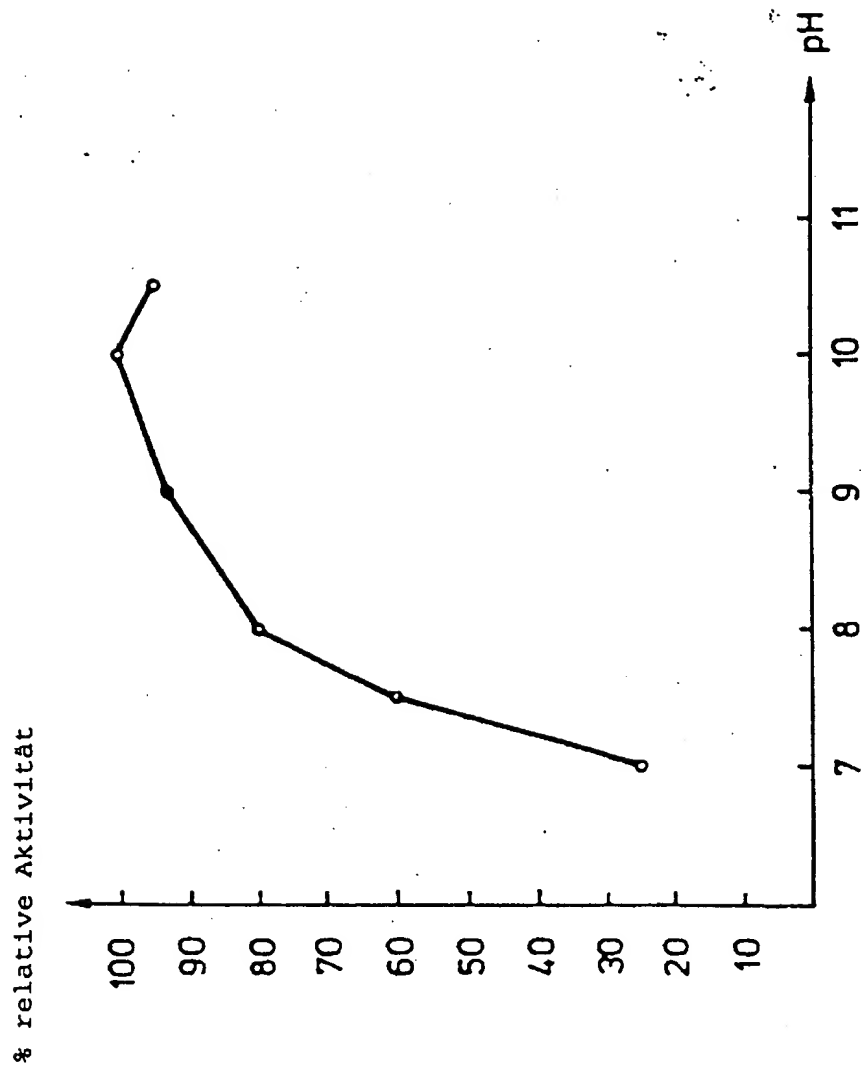


Fig. 3

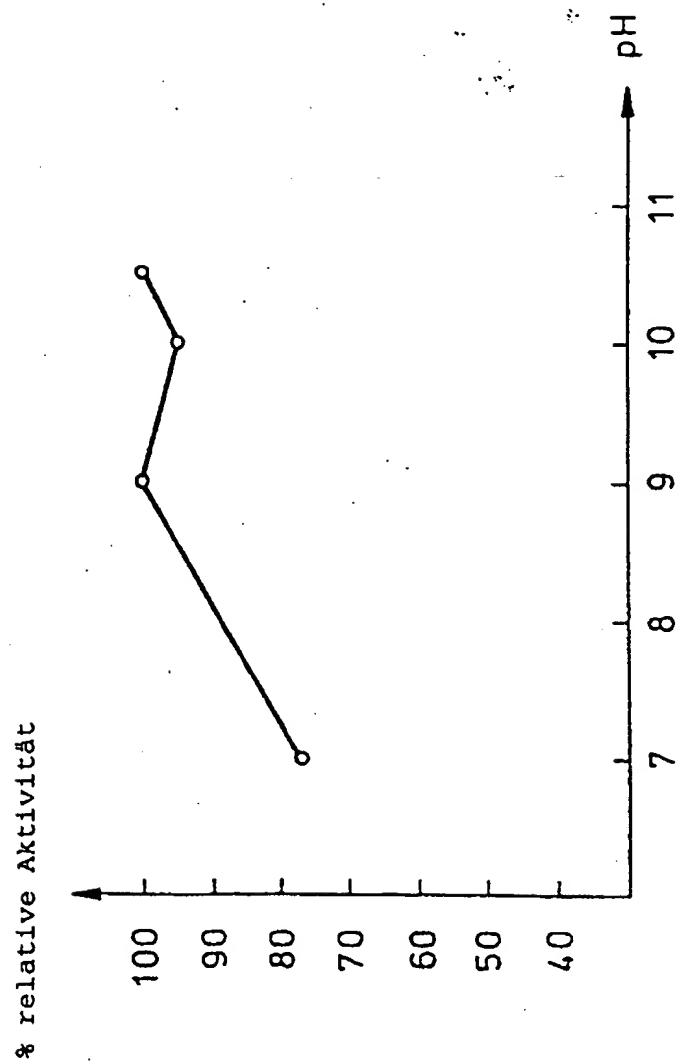


Fig. 4

